

MIKROTUBULÁRIS ULTRASTRUKTÚRÁK ÉS FUNKCIÓK

Foszfofruktokináz, egy glikolitikus enzim és TPPP/p25, egy szerkezet nélküli fehérje hatásai

Lehotzky Attila

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola (vezetője: Dr. Erdei Anna)

Molekuláris Sejt- és Neurobiológiai Program (vezetője: Dr. Sass Miklós)

Témavezető: Dr. Ovádi Judit

Tudományos tanácsadó

Egyetemi konzulens: Dr. Kovács János

Professzor, egyetemi tanár

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Enzimológiai Intézet

Budapest, 2010

TARTALOMJEGYZÉK

I.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	3
II.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
III.	BEVEZETÉS	5
III.1	Mikrotubuláris rendszer főbb jellemzői	5
III.2	Glikolízis mint fő energiaforrás a citoszolban	7
III.3	Új szereplők és új tulajdonság a citoszolban: szerkezet nélküli fehérjék	8
III.4	Oligodendrociták szerepe az agyszövetben	10
III.5	Fehérjekifejeződés szabályozása mRNS szinten	11
IV.	CÉLKITŰZÉSEK	11
V.	MÓDSZEREK	12
VI.	EREDMÉNYEK	14
VI.1	Mikrotubuláris rendszer és a foszfofruktokináz kapcsolata	14
VI.2	Mikrotubuláris rendszer a TPPP/p25 fehérje elsődleges célpontja	17
VI.2.A	TPPP/p25 expresszió transzfektált humán sejtekben	17
VI.2.B	TPPP/p25 transzgén vonal glükóz metabolizmusa	21
VI.2.C	TPPP/p25 kapcsolata neurodegenerációval	22
VI.3	TPPP/p25 szerepe az oligodendrocita differenciációban	24
VII.	KÖVETKEZTETÉSEK	26
VIII.	IRODALOMJEGYZÉK	30
IX.	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	34
X.	ÖSSZEFOGLALÁS	36
XI.	SUMMARY	37

I. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, Dr. Ovádi Juditnak, hogy munkacsoportjában dolgozhattam és munkámat irányította. Külön köszönettel tartozom Kovács János Professzor Úrnak, egyetemi konzulensemnek, tanáromnak, aki hosszú évek óta kutatócsoportunkkal együttműködik, így dolgozatom elkészítéséhez is elektronmikroszkópiás vizsgálataival jelentősen hozzájárult. Köszönöm Dr. Orosz Ferenc, dr. Oláh Judit és a Sejt Architektúra kutatócsoport minden tagjának támogatását segítségét és szíves együttműködését. Köszönet illeti dr. Kovács Gábort, ma már a Bécsi Egyetem Neurológiai Intézetének professzorát a humán patológiás agyszöveti mintákkal kapcsolatos munkákban való együttműködéséért. Köszönöm a Richter Gedeon Nyrt.-nek hogy pályám kezdetén lehetővé tette számomra, hogy az MTA Enzimológiai Intézetében nevelődhsek. Itt köszönném meg Dr. Pázmány Tamásnak, hogy utat mutatott a sejtbiológia tudományának műveléséhez.

Feleségem támogatását, gyermekeim türelmét, megértését nem tudom eléggé megköszönni.

II. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BioGPS: <http://biogps.gnf.org/#goto=welcome>

CNTF: ciliary neurotrophic factor; ciliáris neurotrofikus faktor

CopGFP: green fluorescent protein; zöld fluoreszcens fehérje változat

EGFP: Enhanced green fluorescent protein; javított zöld fluoreszcens fehérje

EmGFP: Emerald green fluorescent protein; smaragdzöld fluoreszcens fehérje

F-1,6-P₂: fructose-1,6-bisphosphate; fruktóz-1,6-biszfoszfát

F-2,6-P₂: fructose-2,6-bisphosphate; fruktóz-2,6-biszfoszfát

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz

MAP: Microtubule-associated protein; mikrotubulus asszociált fehérje

MT: microtubulus; mikrotubulus

NCI60: a National Cancer Institute 60 rákos sejtvonalból álló gyűjteménye

PFK: phosphofructokinase; foszfofruktokináz

PLO: poly-L-ornithine,; poli-L-oritin

UPS: ubiquitin-proteasome system; ubiquitin-proteasóma rendszer

T3: 3,3',5'-triiodo-L-thyronine; 3,3',5'-trijód-L-tironin

TMRE: tetramethyl-rhodamine ethyl ester; tetrametil-rodamin etil-észterTPPP/p25: Tubulin

TPPP/p25: Tubulin Polymerization Promoting Protein /protein tömege 25 kDa

III. BEVEZETÉS

III.1 Mikrotubuláris rendszer főbb jellemzői

Az eukarióta sejt felépítése a funkcionális szerveződés gyönyörű példája. A plazmamembrán által határolva térben és időben szétváló folyamatok játszódhatnak le, oly módon, hogy a közöttük lévő kommunikáció számos módon megnyilvánul. A sejt alakját, formáját a plazmamembránt kifestítő és mozgató vékonyfilament rendszer határozza meg, a belső vázat pedig a makrofilament, azaz a mikrotubuláris rendszer és az intermedier filament rendszer biztosítja. A sejt belső szerkezete nem állandó, dinamikusan változhat feladatai és környezete függvényében. Az intermedier filamentumok a sejtközeg mechanikai stabilitásáért felelősek; a mikrotubuláris rendszer komplex feladatai és tulajdonságainak főbb jellemzői a következők.

A mikrotubulusokat az α - és β -tubulin alegységekből álló heterodimerek polimerizációja hozza létre (Oakley, 2000). A vázszerkezet kialakulásához szükséges a γ -tubulin dimerekből felépülő sejtközpont. A polimerizáció során a tubulin dimer β -alegységéhez kötött GTP-jét a tubulin GTP-áz aktivitása elbontja. A polimerizáció során először lineáris protofilamentumok képződnek, ezekből 13 áll össze tubulussá. A polimerizáció során létrejött tubulus mintegy 25 nm átmérőjű, a dimerek spirál alakban futva építik fel a polimer vázát, fej-láb kapcsolattal. A mikrotubuluson az alegységek C-terminálisai hozzáférhetőek, a sejt számára nyitott szerveződési felületet biztosítanak a különböző kölcsönhatások számára, dominánsan negatív felszint biztosítva a savas oldallancok jelenléte miatt. A felépülő szálak aszimmetriát hordoznak, megkülönböztethető a két végük (plusz vég: β -alegység a felületen és mínusz vég: α -alegység a felületen), ahol a dimerek asszociációja, illetve disszociációja történik (Wade, 2009). A mikrotubuláris rendszerre jellemző a dinamikus instabilitás, amelyet a sejt működése során szabályoz a megfelelő viselkedés biztosítására. Ennek során az egyedi mikrotubulus véletlenszerűen összeomolhat, széteshet. Egyensúlyi állapotban a plusz és a mínusz végen azonos sebességgel folyik a tubulin dimerek asszociációja, illetve disszociációja, így a mikrotubulus hossza állandó, de anyaga folyamatosan megújul („treadmilling”), ez leginkább az axonokra jellemző állapot. Az így kiépülő mikrotubuláris rendszer, hálózat egyrészt a sejt váz felépítésében vesz részt, szerepe van különböző sejtben belüli transzportfolyamatokban a mikrotubulusokhoz asszociált motorfehérjék segítségével, és bizonyos sejtszervekkel (mint a mitokondriumok, és az endoplazmatikus retikulum) is kölcsönhatásba lép, mozgatja őket, illetve vázat biztosít számukra.

A mikrotubuláris rendszer a sejtmozgásban, és a sejtnyúlványok kialakulásában is részt vesz, a vékonyfilament rendszerrel együtt. A mikrotubulusokhoz a sejten belül specifikus fehérjék kötődnek. A stabilan (izolálható módon) kötődő fehérjék, a Mikrotubulus Asszociált Proteinek (MAP-ek), a mikrotubulusok szerkezeti és szerveződési tulajdonságait befolyásolják, mint például az MAP2 vagy a tau fehérjék, melyek mikrotubulus-keresztikötő fehérjék az idegsejtnyúlványokban. Fontosságukat hangsúlyozza, hogy kölcsönhatásuk szabályozásának zavara neurofibrilláris lerakódásokhoz vezet, ami az Alzheimer-kórra és más tauopátiákra jellemző (Mandelkow et al., 1995).

A mikrotubuláris váz komplex szabályozási folyamatai különböző mechanizmusok révén valósulnak meg. Egyrészt a láncok szövetspecifikus izoformái ismertek (Oakley, 2000), másrészt funkciófüggő enzimatisz módosítások segítenek a rendszer felépítésében és tulajdonságainak módosításában. Ilyenek a már említett acetiláció, foszforiláció (a MAP-ek mikrotubulus kötési képességét befolyásolja), a detiroziláció, a (poli)-glutamiláció és a (poli)-glicileződés. Ezek közül több folyamat funkciójáról, és azok szabályozásáról még hiányos ismereteink vannak (Verhey & Gaertig, 2007; Fukushima et al., 2009). Továbbá a mikrotubuláris rendszerrel kölcsönható fehérjék, MAP-ek is szövetspecifikusak, melyek funkciófüggő módon határozzák meg a mikrotubuláris rendszer tulajdonságait (Nogales, 2000), valamint ezen fehérjék módosulásaiknak megfelelően értelmezik a mikrotubuláris felszínen kódolt információt, amit a különböző módosítások, és azok kombinációi hordoznak (Verhey & Gaertig, 2007; Verdier-Pinard et al., 2009).

A mikrotubulusok dinamikus szerveződése révén valósul meg az osztódás során a megkettőződött kromoszómák szétválása. A mikrotubuláris rendszer a transzportfolyamatokban fontos szerepet játszik különösen az extra méretű nyúlványokkal rendelkező differenciált sejtekben, ilyenek például az oligodendrociták, vagy a neuronok. A transzportfolyamatok szükségese a lokálisan a mielinmembránban szintetizálódó fehérjék kifejeződéséhez is (Braun, 2009). Ugyanakkor a neuronális sejtekben lokalizált változások történnek, például fehérjék szintézise az aktív szinapsziszokban, amiben ugyancsak speciális és irányított transzportfolyamatok (is) szerepet játszanak (Jiang & Schuman, 2002). A transzportfolyamatokhoz fontosnak tekinthető a mikrotubuláris rendszer speciális poszttranszlációs módosítása, az α -tubulin lánc Lys-40 aminosavának acetilációja, amely a motorfehérjék fokozott kötődését váltja ki elsődleges (Reed et al., 2006).

III.2 Glikolízis mint fő energiaforrás a citoszolban

A sejtek energiaháztartásának alapja a sejtek közötti rendszerekből (vér, szövetközi folyadék) aktív transzporttal felvett glükóz. A felvett glükóz részben a citoszolban (glikolízis), részben pedig a mitokondriumokban (Szentgyörgyi-Krebs-ciklus és terminális oxidáció) kémiai energiává alakul át enzimatisz folyamatok révén, amit a folyamat során keletkező adenosin-trifoszfát, ATP, nagyenergiájú foszfátkötései tárolnak elsődlegesen. Míg az egyedi glikolitikus enzimek szerkezete, működése és szabályozásuk régóta részletesen tanulmányozott, a glikolízis összehangolt folyamatának szabályozásának vizsgálata sejt szinten sokkal később kezdődött. Ismertté vált, hogy ezen enzimek a sejtek nagy kompartmentjeiben, ahol a fehérjekoncentráció magas, komplexeket képeznek egymással, kötődnek a sejt vázhoz, de más metabolikus enzimekkel és struktúrfehérjékkel is képesek komplexeket létrehozni. Különböző szubsztrátok és mediátorok is módosíthatják az enzimek aktivitását és kölcsönhatásait (Ovádi, 1988, Knull & Walsh, 1992). Mindezen hatások összetett következményekkel járnak, amelyek magyarázatához olyan új fogalmakat kellett bevezetni, mint a szubsztrát átadás („channelling”) és a kompartmentalizáció (összefoglaló Ovádi, 1991). A rendszerszintű metabolizmus vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a glikolízis sebességének meghatározásához a három kináz enzim, a hexokináz (HK1, EC 2.7.1.1), a foszfofruktokináz-1 (PFK EC 2.7.1.11) és a piruvát kináz (PK, EC 2.7.1.40) jelentős mértékben járul hozzá.

A PFK homotetramer struktúrájú, három izoenzime van (izom, agy és máj formák), különböző szöveti előfordulással. Az izom típusú PFK szabályozása igen összetett, mivel a monomer lánc komplex egyensúlyi folyamatokban képes többszörösen oligomerizálódni, amely formák közül csak a tetramer aktív enzimatisz. Ezeket az egyensúlyokat számos kis molekula, faktor (pl. ATP, ADP, citrát, laktát, foszfát) és a sejtben belüli rendszerek is szabályozzák. A faktorok egy része az oligomerizációs állapotot befolyásolja, míg mások alloszterikus módon változtatják meg az enzim aktivitását, azonban *in vitro* és *in vivo* rendszerben eltérhet hatásuk (Pettigrew & Frieden, 1979). A PFK glikolízisben betöltött szerepének fontosságát hangsúlyozza, hogy a fruktóz-6-foszfát átalakulása gyakorlatilag irreverzibilis, az ellentétes irányú reakciót szokatlan módon egy külön enzim szabályozza, a fruktóz-1,6-bisfoszfátáz (FBP: EC 3.1.3.11). A PFK kulcsfontosságú aktivátora a fruktóz-2,6-bisfoszfát.

A glikolitikus enzimek a sejt váz alkotóelemeivel való kapcsolatainak a vizsgálata magasabb rendű szervezetekben az izom működésének kapcsán kezdődött, ahol az aktin szerveződése kulcsfontosságú a szövet szempontjából. Így az izom típusú PFK-nak és más

glikolitikus enzimeknek az izom aktint tartalmazó vékonyfilament rendszerrel történő kölcsönhatásait vizsgálták először (Knull & Walsh, 1992). A glikolitikus enzimek mikrotubuláris rendszerrel való kölcsönhatásainak vizsgálata különös jelentőségű, mivel a mikrotubuláris rendszer a domináns sejtvázkalkító az agyszövetben, ahol a fő energiaforrás a glükóz. Munkacsoportunkban is kimutatták korábban, hogy a glikolitikus enzimekre leírt szabályozó mechanizmusok, melyeket híg oldatokban detektáltak, a fiziológiás körülmények között módosulhatnak (Ovádi et al, 1986; Aragon & Sols, 1991).

Az agyszövet, viszonylagos kis mérete ellenére a vérből jelentős mennyiségű glükózt vesz fel, míg az izomszövetre a glikogén formájában tárolt glükóz felszabadítása jellemző a munkavégzés során. Az asztrociták egyik feladata a glikolízis és a neuronok számára az energia biztosítása. Az asztrociták tárolják a vérből felvett glükózt glikogén formájában, amit az idegi aktivitás érzékelése esetén lebonthatnak glükózzá és laktáttá, és a szövetközi térbe szekretálnak (glükóz), vagy glia-neuron kapcsolaton keresztül adnak át (laktát), amelyet az aktív neuron felvesz, felhasználva azt lokalizált és intenzív energiaforrásként (összefoglaló Magistretti, 2006). Vagyis a metabolikus aktivitást a különböző típusú sejt-sejt kapcsolatok is szabályozhatják az agyszövetben.

III.3 Új szereplők és új tulajdonság a citoszolban: szerkezet nélküli fehérjék

A humán proteom jelentős része jól definiált 3D szerkezettel bíró fehérjékből áll. A határozott szerkezet és a funkció közötti kapcsolat korábban egyértelmű volt a tudományág képviselői számára, a szerkezeten belüli minimális mozgás hordozhatott ugyan funkcionális következményt, de az általános és elfogadott elképzelés szerint egy fehérjelánc egésze határozott harmadlagos szerkezettel bír. A humán genom teljes megismerése után azonban bebizonyosodott, hogy a hipotetikus fehérjék mintegy 1/3 része nem rendelkezik határozott térszerkezettel (Dunker et al., 2002). Ez azt mutatta, hogy az ilyen eredendően szerkezet nélküli, vagy másképpen rendezetlen fehérjék tehát általánosan előfordulnak az élővilágban, különösen a magasabbrendű szervezetekben. A szerkezeti rendezetlenség ugyanakkor csak a szabad állapotukra jellemző, amikor is gyorsan lebontódnak a sejten belül; kölcsönható partnerekkel határozott szerkezetet képesek felvenni és stabilitásuk is megnő (Dyson & Wright, 2002). A fehérjeszerkezeti rendezetlenséget, mint lehetséges biológiai funkciót már egész korán felvetették az immunkomplexek működésének vizsgálatánál elvi síkon (Pauling & Delbrück, 1940). A kérdés részletesebb vizsgálata azonban nemrég kezdődött (összefoglaló Dunker et al., 2008). A

szerkezeti rendezetlenség egy fehérjénél megengedheti a többszörös funkciót több kölcsönható partnerrel, vagy több tulajdonság együttes meglétét; de jelentheti a szabályozási folyamatok fokozott érzékenységét a szerkezet érzékenysége miatt. Ma már ismert, hogy a rendezetlen fehérjék olyan betegségek létrejöttében játszanak főszerepet, ahol a konformációs szabadság következményeként a biológiai rendszerekben extra stabilitású struktúrák jönnek létre a sejt, vagy a szövet számára káros hatással. Ennek hátterében aberráns fehérje-fehérje kölcsönhatások lehetnek, melyek aggregációhoz, zárványtestek kialakulásához vezetnek. Ilyen jellemző szerkezet nélküli fehérjék a β -amiloid, az α -szinuklein, vagy a mutáns huntingtin. A szerkezet nélküli fehérjék szerepe miatt az aggregátum képződéssel járó betegségeket összefoglaló néven konformációs betegségeknél is nevezik, utalva a közös mechanizmusra, mely szerint a betegség elindítását szerkezet nélküli vagy nem megfelelő szerkezetű fehérjék (unfolded/misfolded proteins) jelenléte okozza, a betegségre jellemző fehérje peptidláncának, vagy annak egy részletének aggregáló struktúrába szerveződésével, és ezen struktúrák toxikus hatásával (Thompson & Barrow, 2002).

A sejtben természetesen komplex mechanizmusok működnek ezeknek a káros folyamatoknak a csökkentésére. A rosszul feltekert, hibásan szerkesztett, oxidatíván károsodott, vagy a szerkezet nélküli, rendezetlen és nem komplexált fehérjéket a sejt azonosítja, javítani próbálja, jelenlétükre hő sokk-fehérjék szintézisével reagál, illetve szelektíven képes degradálni őket az ubiquitin-proteasóma vagy más proteolitikus rendszerek segítségével (Sherman & Goldberg, 2001; Goldberg, 2003).

Kutatócsoportunk felfedezett egy új, agyspecifikus, eredendően szerkezet nélküli fehérjét, agyszövetből izolálva, mint egy olyan faktort, amely képes mikrotubuláris polimerizációt, illetve aggregációt okozni *in vitro*, valamint a paclitaxel-stabilizált mikrotubulusokat keresztköti (Hlavanda et al., 2002). Részletes szerkezetvizsgálatok alapján 5%-ra tehető α -hélix tartalommal bírt, és más határozott másodlagos szerkezetet még kettős jelzett NMR vizsgálatokkal sem sikerült kimutatni. Az izolált fehérje, amit funkciója és móltömege alapján Tubulin Polymerization Promoting Proteinnek (TPPP/p25) nevezett el a csoport, azonosnak bizonyult egy korábban már leírt, agyspecifikus fehérjével, amelyet oligodendrocitákban fordul elő immunhisztokémia alapján (Takahashi et al., 1993). Újabb eredményeink szerint a TPPP/p25 két másik fehérjével együtt egy eddig ismeretlen fehérjecsaládot alkot (Vincze et al., 2006). Munkacsoportunk vizsgálatai alapján több foszforilációs hely is azonosítható az agyszövetből izolált fehérjén, a foszforiláció *in vitro* is elvégezhető az N-terminális szignál szekvencián

enzimekkel (Hlavanda et al., 2007). Agyszöveti előfordulása mellett a TPPP/p25 *in silico* genomális összehasonlító vizsgálatok alapján a csilló komponense is (Orosz & Ovádi, 2008).

III.4 Oligodendrociták szerepe az agyszövetben

Az oligodendrociták az agyszövet speciális gliasejtjei, fő feladatuk a mielin hüvely létrehozása az axonokon, a megfelelő idegi ingerület átadáshoz és az axon védelméhez. A speciális szerkezetű és nagyméretű membrán létrehozásához intenzív lipidszintézist folytatnak, emiatt intenzív glikolízis jellemzi őket. A mielin membrán tulajdonságainak kialakításához hozzájárul magas koleszterol tartalma, amelyet az oligodendrocita szintetizál (Bartzokis, 2004). Az egyedfejlődés során a születés után jelennek meg; jellegzetes bipoláris formájú progenitor sejtek megkeresik a stabilizálódott axonokat és létrehozzák a mielinhüvelyt. Koordinált módon, számos fehérje jelenik meg a mielinizációhoz szükséges differenciáció során, és a sejtvázas drasztikusan átalakul. Ezt a folyamatot *in vitro* is lehet tanulmányozni, a megfelelő tropikus faktorok jelenlétében lehetséges neuronok nélkül is kiváltani a differenciációt. A differenciáció során az oligodendrocitáknál eltűnik a sejtközpont (a progenitor sejtekben még megtalálható), helyette a sejtmagot egy nagyobb méretű γ -tubulin immunpozitív gyűrű veszi körül *in vitro*. Az oligodendrociták differenciációjának fontos eleme a mikrotubuláris vázrendszer kialakulása az elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges nyúlványokkal, amelyeket mikrotubulusok stabilizálnak. Ez az állapot a mielinizáció előtti állapotnak felel meg, az axon-kapcsolat keresésének tekinthető, és a vékonyfilament rendszer is aktívan részt vesz benne. Intermediér filamentek nem találhatók oligodendrocitákban. Az axonon kialakuló, azt beburkoló mielin membrán létrejöttében is fontos szerepe van a mikrotubuláris rendszernek, bár a kompakt mielin nem tartalmaz mikrotubulusokat. Mielin létrejöttéhez az axonális kapcsolat szükséges. Intenzív transzportfolyamatok szükségesek a mielin integritásának megőrzéséhez, és az egyes speciális membránfehérjék lokális szintéziséhez (összefoglaló Bauer et al., 2009). Mielinhüvely nélkül az axon ingerületvezetése csökken, sérülékennyé válik a környezeti hatásokra. Az újonnan kialakuló oligodendrociták az agyban időskorig képesek a mielinhüvely hiányát pótolni. A re-mielinizáció folyamatának károsodása vagy elmaradása többféle agyi kórkép kialakulásához vezethet (Bartzokis, 2004).

III.5 Fehérjekifejeződés szabályozása mRNS szintjén

A nem kódoló mikroRNS-ek a fehérjekifejeződés szabályozásának új szintjét jelentik. A fehérjék jelentős része érintett ebben a szabályozási folyamatban. A mikroRNS-ek DNS-ről hosszabb RNS szakaszok formájában íródnak át, majd magbéli és citoszolikus szerkesztési folyamatok után, rövid 22-23 nukleotidpárnnyi RNS-ek keletkeznek a citoszolban, a RISC-hez (RNA-induced silencing complex) kötöttek, egyszálú mikroRNS-ként. Ezek a célfehérjéik 3'-UTR komplementer régiójához csatlakozva, lelassíthatják az átírást, vagy módosíthatják az adott mRNS-t élettidejét; elsősorban csökkentik a mRNS stabilitását, de az ellentétes hatásra is van példa. Stressz vagy más fiziológiás folyamat érzékelése esetén az mRNS felszabadulhat a mikroRNS hatása alól, egyfajta gyors választ biztosítva a sejt számára (Ambros, 2001; Siomi & Siomi, 2009). Nemcsak olyan fiziológiás folyamatok, mint például a differenciáció vagy a sejtciklus szabályozásában vesznek részt, hanem egyes specifikus mikroRNS-ek deregulációja rákos átalakulásokban, vagy más betegségek kialakulásában is megfigyelhető. Emiatt vizsgálatuk, eltéréseik tanulmányozása kóros állapotokban intenzíven folyik. Bejuttatásukkal célzottan lehetséges módosítani a szöveti fehérjék szintjét, rendszerszinten, egyszerre több molekuláris célpontot befolyásolva, akár eltérően is, emiatt potenciális gyógyászati módszer lehet alkalmazásuk, amit nagy érdeklődés kísér (Hagen & Lai, 2008).

IV. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám célja egyrészt azon mikrotubuláris ultrastruktúrák jellemzése volt, amelyek citoplazmatikus, a mikrotubulushoz dinamikusan kötődő fehérjékkel történő kölcsönhatások révén alakulnak ki, egyrészt a metabolizmusra gyakorolt hatásukra koncentrálni, másrészt a mikrotubuláris váz tulajdonságainak változásait elemezve; továbbá ezen ultrastruktúrák funkcióinak vizsgálata, fiziológiás és patológias folyamatokban betöltött szerepének molekuláris és sejtszintű elemzése volt. E célból jellemeztem

- i) a mikrotubuláris rendszer és egy fontos glikolitikus enzim, a foszfofruktokináz *in vitro* kölcsönhatásait, annak a kináz működésére és a mikrotubuláris rendszer struktúrájára gyakorolt hatásait; a kölcsönhatás specifikus effektorokkal való modulálását;
- ii) egy szerkezet nélküli fehérje, a TPPP/p25 kifejeződésének energiametabolizmusra gyakorolt molekuláris és sejtszintű hatását;

- iii) a mikrotubuláris rendszer és a TPPP/p25 kölcsönhatását, annak szerkezeti és funkcionális megnyilvánulásait ún. egy-sejtes kísérletekben;
- iv) az endogén TPPP/p25 szerepét az oligodendrociták mikrotubulus alapú nyúlványképzésében.

V. MÓDSZEREK

A módszerek részletes ismertetése a dolgozathoz csatolt publikációkban találhatóak.

Tubulin preparálása. Kísérleteimhez a MAP-mentes tubulint friss marhaagyból izoláltam, ammónium szulfátos frakcionálással, majd DEAE-gyantán történő ioncserés kromatográfiával (Na & Timasheff, 1982). A tisztított fehérjét 1 M szacharóz pufferben dializáltam, majd -70 °C-on tároltam. A preparátum tisztaságát SDS-gélelektroforézis segítségével ellenőriztem.

Fluoreszcencia anizotrópia mérések. A mérésekhez a PFK-t jelöltem fluorescein-izotiocianáttal, és 470 nm gerjesztésnél 520 nm-en detektáltam az emittált fényt. Az emisszió horizontális és a vertikális komponenszt mértem, melynek alapján a fluoreszcencia anizotrópia értékeket határoztam meg, mely a molekula tömegre ad felvilágosítást. A méréseket Applied Photophysics SP 3 készülékén végeztem.

Foszfofruktokináz aktivitás mérés. A mérések során a fruktóz-6-foszfát fruktóz-1,6-difoszfáttá történő átalakulást követtem kapcsolt enzimreakciók segítségével; a NADH fogyását keresztül spektrofotometriával 340 nm-en. Az elegy a vizsgálandó komponensek mellett magnézium-ATP-t, fruktóz-6-foszfátot, aldolázt, triózfoszfát izomerázt és glicerol-foszfát dehidrogenázt tartalmazott; az átalakulást a kezdeti sebességgel jellemeztem. A mérésekhez HP-8451A spektrofotométert használtam.

Tubulin polimerizáció követése turbidimetriával. A tubulin paclitaxel kiváltotta polimerizációját spektrofotometriásan követtem, 350 nm-en mérve az abszorbancia növekedését (turbiditásmérés). HP-8451A spektrofotométeren követtem a polimerizációt PFK jelen és távollétében.

Kötődési vizsgálatok ülepítéssel kísérletekben. Tisztított fehérjék segítségével vizsgáltam a paclitaxel stabilizált mikrotubulus és a PFK kölcsönhatását, centrifugálással izolálva a mikrotubulushoz kötődő enzimfrakciót, majd SDS-gélelektroforézis után denzitometrálással mértem a kötött (ülepített) és a szabad (oldott fázisú) fehérjék mennyiségét. A kísérlet során

paclitaxel stabilizált mikrotubulusokat használtam. Hasonlóan vizsgáltam a PFK-ra ható különböző effektor vegyületek és szubsztrátok hatását a PFK-mikrotubulus keresztkötésre. A polimerizációs végrehajtása után a reakcióelegyből centrifugálással elektronmikroszkópiás vizsgálatokhoz is készítettem mintákat.

Immunizálás és antiszérumok karakterizálása. PFK-ellenes antiszérumot készítettem patkányok immunizálásával, amihez izom PFK preparátumát használtam fel. Továbbá kollaborációban készített TPPP/p25 elleni szérumokat is jellemeztem (a TPPP/p25 peptidszakasza hordozón, és teljes protein elleni immunizációk). A szérumok titerét ELISA módszerrel határoztam meg, mérve a szérum hígítási görbéket. A TPPP/p25 szérumok specifitásának vizsgálatára immunblot technikát használtam marhaagy extraktot elemezve.

Sejtenyésztés és differenciáció. A HeLa (humán adenokarcinóma), SK-N-MC (humán neuroblasztóma), CG-4 (patkány oligodendrocita/O2-A asztrocita progenitor), CHO-Tet-On sejtekkel végeztem sejtszintű vizsgálataimat. A CG-4 sejtek számára B104 (patkány neuroblasztóma) sejtvonal segítségével állítottam elő a kondicionált médiumot, amely az esszenciális növekedési faktorokat tartalmazza. A CG-4 sejtek differenciációját CNTF és T3 adásával támogattam (Wang et al., 2006).

Humán sejtek tranziens transzfekciója fluoreszcens fúziós fehérje plazmidjával. Mikroszkópos vizsgálatokhoz üveglemezen tenyésztettem a HeLa sejteket. Transzfekcióhoz Eugene 6, vagy Eugene HD reagenset használtam a plazmid konstrukció beviteléhez. A mintákat 24 órás inkubáció után vizsgáltam.

Stabil sejtvonalak előállítás. Klónszelekcióhoz EGFP-TPPP/p25 plazmiddal transzfektáltam SK-N-MC sejteket szövettenyésztő edényben, majd két nap után G-418 tartalmú szelekciós médiumban tartottam a tenyészetet. Az egyedi klónokat kialakulásuk, mintegy 3 hétig tartó tenyésztés után izoláltam, majd vizsgáltam az EGFP-TPPP/p25 expresszióját immunblot technikával. A vizsgálatok alapján a K4 elnevezésű klónnal dolgoztam tovább. Nem konjugált TPPP/p25-t expresszáló rendszer létrehozásához a CHO-Tet-On sejtvonalat pTRE2hyg-TPPP/p25 plazmiddal transzfektáltam, majd higromicin tartalmú szelekciós médiumban tartottam a tenyészetet, az egyedi klónokat izoláltam, és immunblot alapján vizsgáltam doxiciklin-függő TPPP/p25 expressziójukat. A vizsgálatok alapján a CHO10 elnevezésű klónt választottam ki.

Mitokondriális membrán polarizáció jellemzése. A vizsgálatban tetrametil-rodamin etil-észtert (TMRE) használtam, amely membránpotenciál-függő módon gyűlik fel az élő sejt mitokondriumában. Nem fixálható festék. Üveglemezen tenyésztett tranziensen expresszált

HeLa sejteket, vagy transzgén K4 sejteket vizsgáltam, az EGFP-TPPP/p25 megjelenésének morfológiai és energetikai következményeinek szempontjából. A sejteket nem-fluoreszkáló médiumban mostam, majd temperált körülmények között preparáltam, és vizsgáltam. (Collins and Bootman, 2003). A mintákat egy órán belül felhasználtam.

Primer oligodendrocita tenyésztet előállítás. A primer oligodendrocita prekursor sejteket 1-2 napos patkányok agytenyésztetéből, felrázásos technikával izoláltam (Armstrong, 1998). Konfluens agyi szövettényesztet állítottam elő, majd a mikroglia sejtek mennyiségét egy rövid időtartamú rázással csökkentettem és komplett médiumcsere után azonnal egy hosszabb rázással izoláltam az oligodendrocita prekursor sejteket. A prekursor sejteket számolás után poli-L-ornitin (PLO) kezelt tenyésztedényekben szaporítottam, vagy differenciáltattam oligodendrocitává. Fluoreszcens immuncitokémiai módszerrel vizsgáltam az oligodendrociták jellemző fehérjét, illetve a tubulin és a TPPP/p25 lokalizációját és a TPPP/p25 kifejeződésének gátlásakor bekövetkezett változásokat. Virális transzdukció a primer oligodendrocita tenyésztet esetében az együttműködő partner laboratóriumában történt (Dr. Lau, NIH NINDS, USA), a mintákat fixálás után kaptam meg és vizsgáltam.

Immunfluoreszcens vizsgálatok. A HeLa és CG-4 sejteket üveglemezen tenyésztettem az immuncitokémiai vizsgálatokhoz. Primer oligodendrocitákat PLO-kezelt 6-lyukú szövettényesztő edényben differenciáltattam. A mintákat fixáltam, hideg metanol, hideg pufferolt etanol, vagy pufferolt formaldehid-glutáraldehid fixálószerrel. Fluoreszcens vizsgálatokhoz Leica DMLS típusú mikroszkópot használtam, a ráépített digitális CCD kamerával és Spot vezérlőszofverrel a képek rögzítéséhez (Digital Instruments).

Mikroszkópos képanalízis. Fluoreszcens intenzitásmérésekhez az NIH ImageJ Windows verzióját használtam. Az elemzett digitalizált képeket azonos expozíciós körülmények között készítettem. Az eredmények statisztikai vizsgálatokhoz t-próbát használtam.

VI. EREDMÉNYEK

VI.1 *Mikrotubuláris rendszer és a foszfofruktokináz kapcsolata (Lehotzky et al., 1993; Lehotzky et al., 1994; Vértessy et al., 1997)*

Az izom típusú izolált tetramer PFK hígításra, valamint specifikus ligandok hatására dimerekre, majd monomerekre disszociál, mely folyamat következménye az enzim aktivitásvesztése. Kimutattam fluoreszcencia anizotrópia, szedimentáció, és turbidimetriás

mérésekkel, hogy a PFK kölcsönhat mind a tubulinnal, mind polimerizált formájával, a mikrotubulussal. Anizotrópiás méréssel meghatároztam a fluoreszcens-jelzett tetramer PFK oligomer formáira jellemző egyensúlyi állandókat, és megállapítottam, hogy a tubulin-PFK kölcsönhatás a PFK dimerek stabilizációjához vezet. Enzimaktivitás mérésekkel igazoltam, hogy a kimutatott dimer PFK-tubulin kölcsönhatás következménye a kináz aktivitásvesztése. Anizotrópiás mérésekkel jellemeztem a tubulin-PFK kölcsönhatást, szedimentációs kísérletekkel a mikrotubulus-PFK kölcsönhatást elemeztem. Vizsgálataim azt mutatták, hogy a PFK kötődése mind a tubulinhoz, mind a mikrotubulushoz koncentrációfüggő. A tetramer enzim nem köt, de a disszociált formák, a dimer és a monomer PFK igen. A többszörös egyensúlyokat, a PFK-tubulin/mikrotubulus rendszer kvantitatív leírását molekuláris modell kidolgozása tette lehetővé. Ennek megfelelően a K_d értékek a tubulin-PFK monomer, dimer formákra rendre $0,2 \mu\text{M}$ és $0,3 \mu\text{M}$; a mikrotubulus-PFK monomer, dimer formákra rendre $5,0 \mu\text{M}$, és $1,0 \mu\text{M}$ -nak adódtak. Ennek megfelelően a PFK elsődlegesen disszociált állapotban kötődik a tubulin formákhoz. A kötődés affinitása (K_d) mikromólos nagyságrendű, tehát a fiziológias koncentrációviszonyoknál jelentős lehet a komplexképződés (Lehotzky et al., 1993).

A PFK hatását a tubulin polimerizációra vizsgálva, turbiditás mérések alapján megállapítottam, hogy a PFK jelenléte a kontrollhoz képest fokozza a polimerizációra jellemző turbiditásnövekedést, ami a mikrotubulus képződésében bekövetkezett változásra utalt. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal sikerült igazolni, hogy a PFK periodikusan keresztköti a mikrotubulus szálakat, ami turbiditásnövekedést okoz. A létrejövő struktúrák elektronmikroszkópos vizsgálata alapján a keresztkötés kialakulásáért tetramer PFK molekulák a felelősek.



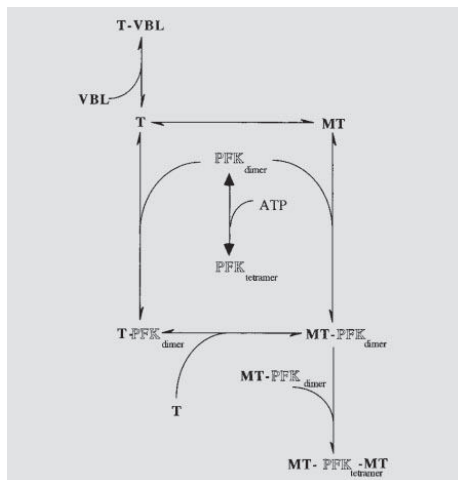
Elektromikroszkópos kép: periodikus tetramer PFK keresztkötés párhuzamosan rendeződött mikrotubulusok között.

A kötési és az aktivitás mérési adatok összevetése alapján megállapítható volt, hogy a

mikrotubulusokhoz preferenciálisan kötődő inaktív dimer kináz (tetramer formában egyébként burkolt) kötőfelszíne szabad, elérhető maradt egy másik mikrotubulushoz hasonlóan asszociált dimer PFK-val való komplexálódás számára, ami biztosítani tudta a keresztkötés kialakulását a két mikrotubulus szál között. A mikrotubulus szálak közötti távolság éppen egy tetramer PFK méretének felelt meg. Ez a PFK tetramer azonban enzimatikusan inaktívnak mutatkozott, amiért többféle mechanizmus lehet felelős. Egy lehetséges magyarázat az, hogy a dimer PFK-mikrotubulus komplexben a kináz ATP kötőhelye sztérikusan gátolt, nem elérhető az ATP számára, emiatt, és/vagy a mikrotubulus felszínének közelsége, a kötődés miatt az aktív konformáció nem tud kialakulni a tetramer PFK-ban. Ezt az a megfigyelés is valószínűsíti, hogy az ATP jelenlétében a heterokomplex nem alakul ki (Lehotzky et al., 1994).

Megállapítottam, hogy az enzim és a mikrotubulusok kölcsönhatását a már ismert PFK-mediátorok csökkentik, ami különböző mechanizmusok révén valósulhat meg. Az aktivátorok jelenléte (ATP, ADP, fruktóz-1.6-biszfoszfát és fruktóz-2.6-biszfoszfát) csökkentették a PFK-indukálta turbiditásnövekedést, és az enzim mikrotubulushoz kötött frakcióját, tehát az enzimatikusan aktív tetramer nem kötődött. A kölcsönhatást a fruktóz-2,6-biszfoszfát csökkentette a legintenzívebben, ami a PFK endogén mediátora. Vizsgálataim azt is mutatták, hogy a mikrotubulus-PFK kölcsönhatásra hatására a mikrotubulusok tulajdonságai is megváltoztak, a keresztkötött mikrotubulusok rezisztenssé váltak depolimerizáló hatásokkal, mint hűtés vagy a vinblasztinnal való kezeléssel szemben. (Lehotzky et al., 1994).

A mikrotubulus és PFK kölcsönhatásának vizsgálatához PFK elleni antiszérumot készítettem és jellemeztem. A szérumot felhasználva, megvizsgáltuk a PFK kötődését mikrotubulusokon, immun-elektronmikroszkópiával. Kimutattuk a PFK-t, mint a mikrotubulusokat keresztkötő fehérjét. Vizsgáltam az ATP hatását a PFK mikrotubulus-keresztkötő képességére és a folyamat megfordíthatóságára. A megindított polimerizációt turbidimetriával követve, megállapítható volt, hogy ATP hozzáadásása meggátolta a PFK-indukálta extra turbiditásnövekedést.



Molekuláris modell: ATP és VBL hatása a tubulin-mikrotubulus és PFK rendszer kölcsönhatásaira.

Tehát disszociált PFK formák leválását idézte elő az ATP, amennyiben a keresztkötődés, azaz a komplexált tetramer kialakulása nem következett be, amihez a gyors mikrotubulus polimerizáció és az ehhez képest lassabb keresztkötés folyamata biztosítja a lehetőséget. Ha a keresztkötődés kialakul a mikrotubulusok között, akkor már nem disszociál a PFK a mikrotubulusokról ATP jelenlétében, amit differenciált szedimentációs kísérletekkel is igazoltunk, amelyben az egyszálú, illetve keresztkötött mikrotubulusok frakciója szétválasztható. Ez alapján a kölcsönhatás mindkét fél számára következménnyel jár; a PFK disszociált formái a mikrotubulusokon lokalizálódva, onnan effektorok hatására ledisszociálva tetramert képezhetnek, amíg a mikrotubulus egyszálú. A mikrotubulusok dinamikáját pedig a keresztkötő tetramer stabilizálhatja, védve azt depolimerizációs hatások ellen (Vértessy et al., 1997).

VI.2 Mikrotubuláris rendszer a TPPP/p25 fehérje elsődleges célpontja

VI.2.A TPPP/p25 expresszió transzjektált humán sejtekben (Lehotzky et al., 2004; Oláh et al., 2006)

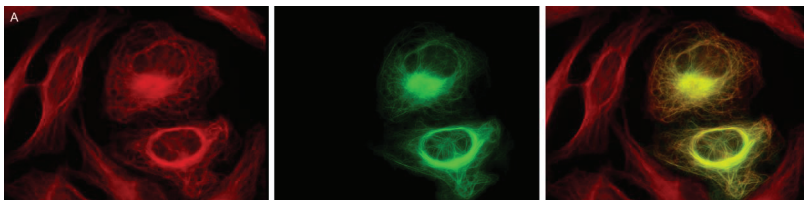
A TPPP/p25 kölcsönhatásainak és fiziológiás viselkedésének jellemzésére különböző emlős sejtvonalakban vizsgáltam kifejeződését immunoblot technikával, sikertelenül. A BioGPS webes adatbázisban végzett kereséseim szerint sem írtak le TPPP/p25 kifejeződését

sejtvonalakban, többek között HeLa humán adenocarcinómában sem (NCI60 sejtvonal gyűjtemény génexpressziós elemzése). Következésképpen, mesterséges módon bevitt exogén fehérjeexpressziót használva humán sejtvonalakon, a TPPP/p25 kódoló szekvenciáját EGFP-vel konjugált formában tartalmazó plazmiddal transzfektáltam sejteket. Így a szelektív jelzést felhasználva, többféle vizsgálat végzésére nyílt lehetőség immár a sejt szintjén, magasabb szerveződési fokon. Továbbá extra lehetőséget szolgáltatott, hogy arra az izgalmas kérdésre keressék választ, mely szerint mi történik egy szerkezet nélküli fehérjével, konkrétan a TPPP/p25-vel a sejtben, humán sejtvonalakban.

Élő HeLa sejtekben végzett nagyfelbontású fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálataim alapján megállapítottam, hogy alacsony expressziós szinteknél az expresszált fehérje egy a mag mellől szétágazó struktúrához kötődik. Az élő sejtek működő mitokondriumait TMRE festékkel jelölve, vizsgáltam a transzfektált sejtekben a mitokondriumok alakját és a festék fluoreszcens jelét, amelyek hasonló voltak a természetben lévő nem transzfektált sejtekéhez, ha az EGFP-TPPP/p25 fluoreszcenciája mag mellől kiinduló, axiális lefutású, és alacsony intenzitású volt. A TPPP/p25 fluoreszcens jelének megoszlása és a mitokondriális aktivitás alapján két további formát sikerült jellemezni. Az egyikben az EGFP-TPPP/p25 egy mag közeli intenzív felhalmozódást mutatott (csomó, azaz aggreszóma), itt a mitokondriumok polarizációja még normális, esetleg csökkent volt, de megoszlásuk már jelezte a sejt stresszreakcióját, rövidülő magkörnyéki felhalmozódások formájában. A másik esetben a konstrukció a magkörüli vastag szálak formájában halmozódott föl, a sejt alakja lekerekedett, és a mitokondriumok polarizációja minimális volt, szintén a magkörüli, rövidebb, töredezett formát mutatva, utalva az esetleges apoptotikus folyamat megindulására (ketrec, „cage”) (Lehotzky et al., 2004; Oláh et al., 2006).

Mivel az EGFP-TPPP/p25 megoszlása alapján valószínűsíthetően valamely filament rendszerhez kötődött, megvizsgáltam immuncitokémiai módszerrel a TPPP/p25 ko-lokalizációját a sejtvázat alkotó egyes filamentumokkal. A tubulin/mikrotubulus rendszer megoszlását a sejten belül DM1-A monoklonális antitesttel vizsgáltam, a vimentint, a HeLa sejt intermedier filamentjének fő alkotóját N9 monoklonális antitesttel mutattam ki. A vékonyfilament vázat fluoreszcensen jelzett falloidin kötődésével jelöltem és vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a TPPP/p25 a mikrotubuláris hálózatnak megfelelően, azon ko-lokalizál, azaz a zöld fluoreszcens jele fiziológiás szerkezetű mikrotubulusokkal együtt látható. A TPPP/p25-öt intenzívebben expresszáló sejtekben azonban a csomó vagy a ketrec extra forma is kialakul, amelyekben vizsgálataim alapján a tubulin/mikrotubulus rendszer átrendeződik. Ha az intenzív magközeli

képlet, a csomó kialakul, a sejtperiférián nem maradnak mikrotubulusok, vagy sajátos kiürülés jellemző a citoszolra, a mikrotubulus szálak ritkábban, vizuálisan vastagabban, és tovább nyúlva láthatóak. Ilyenkor a mag körül is megjelennek a normálisnál vastagabbnak tűnő mikrotubulusok. A normálállapotban perifériáig nyúló mikrotubulusok ehelyett továbbnyúlva a plazmamembrán mentén láthatóak, vagy akár vissza is fordulnak a sejt belseje felé. A másik alak, a mag körüli ketrec. Ebben jellemző, hogy a mag körül kialakul egy, a tubulin antitesttel intenzíven jelölt struktúra. A sejt citoplazmájából a tubulin-mikrotubulus jelzés eltűnik, és ilyenkor megfigyelhető a sejt összehúzódása is.



EGFP-TPPP/p25-indukált mikrotubuláris ultrastruktúrák HeLa sejtekben: aggreszóma és ketrec formák.

Az intermedier filamentumok a TPPP/p25 jelenlétében jellemzőn a mag köré halmozódtak fel, egyfajta korai stresszválaszt jelezve a transzfektált sejt esetében. A vimentin megoszlásának megváltozása arra utal, hogy a TPPP/p25 jelenléte megzavarja a mikrotubulusok és az intermedier filamentumok kölcsönhatását, már az expresszió alacsony szintjénél. Magasabb expresszióknál ez a jelenség fokozottabban mutatkozott, és az intenzitásviszonyok alapján (alacsonyabb vimentinjel a transzfektált sejtekben) feltételezhetően megindult a lebontása is, ami apoptózisra utal (Short et al., 2007). Az aktin alapú mikrofilament váz nem változott a TPPP/p25 jelenlétében, és nem volt kolokalizáció a két jel között. A sejt váz alapjául szolgáló aktinváz a sejt bazális részén helyezkedik el, a TPPP/p25 jele ennél magasabban pozicionálódott. Az aktinváz nem volt érzékeny az EGFP-TPPP/p25 jelenlétére, átrendeződése és a sejt alakjának lekerekedése csak magas expressziós szinteken, jellemzően a ketrecként definiált szerkezetet tartalmazó sejtekben látható. Mindezek alapján igazoltam, hogy a TPPP/p25 elsődleges célpontja a sejten belül a mikrotubuláris rendszer, túlzott kifejeződése HeLa sejtekben pedig a sejt váz egyes alkotóinak átrendeződésével járó folyamatokat indít el, ami sejtpusztuláshoz is vezet.

Videomikroszkópiás megfigyelésekkel az ELTE TTK Biofizika Tanszékén (fáziskontraszt és fluoreszcens megvilágítással) megállapítottuk, hogy az EGFP-TPPP/p25

jelenléte lassítja a sejtosztódást, és intenzív expresszió, azaz magas fehérjeszint esetében sejthalálhoz vezet HeLa sejtvonalban, az expresszálo sejten. A transzfektált sejteket az EGFP fluoreszcencia alapján azonosítottuk. Az expresszálo sejtek osztódása ritka, bár megfigyelhető jelenség volt. A fehérje megjelenése általában osztódás után történt, vagy azután felerősödött, emiatt jellegzetes párban álló transzfektált sejtek figyelhetők meg. Az expresszálo sejtekre jellemző, hogy szokatlanul sok időt töltenek interfázisban, összevetve a természetben lévő, nem transzfektált sejtekkel, bár ezt az effektust kvantitatívan nem jellemeztük (Lehotzky et al., 2004).

Elektronmikroszkópia segítségével, az ELTE TTK Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén vizsgáltuk a TPPP/p25-öt expresszálo HeLa sejtekben megjelenő új mikrotubuláris ultrastruktúrákat. A mag közeli csomó pozíciója alapján benyomul a magmembránba, deformálja annak alakját, jellegzetes, bölcöszerű benyomódást létrehozva, ami gyakran magfestéssel fluoreszcens felvételeken is látható. A centroszóma körüli felhalmozódást a csomóban azonosított centrióla mutatja. A csomó területén, szélein párhuzamosan futó mikrotubulusok és intermedier filamentumok látszódnak, belsejében nem irányított a filamentumok elrendeződése, valamint sérült mitokondriumok és más sejt-szervek membránjai láthatóak. Egyes esetekben a magmembrán sérülése is azonosítható a csomóval érintkező magmembrán szakaszokon. A képlet közvetlen környezetében ép struktúrájú mitokondriumok és endoplazmatikus membránok láthatóak, miközben a távolabbi részekben, a sejt perifériája kiürül, a sejtalkotók a képlet köré halmozódnak fel. Az elektronmikroszkópos vizsgálat alapján csomót tartalmazó TPPP/p25-öt expresszálo HeLa sejt analóg képet mutat a fentebb csomóként leírt élő és fixált sejten megfigyelt és immuncitokémiai képpel, a sejtalkotók mozgása és viselkedése hasonló. Mindezek alapján az EGFP-TPPP/p25 kifejeződésének hatására keletkezett csomó a Johnston és munkatársai által korábban leírt aggreszómának tekinthető (Johnston et al., 1998). E forma mellett a transzfektált sejtek között mindig jelen volt egy magkörüli, párhuzamosan futó mikrotubulusokat és intermedier filamentumokat is tartalmazó alak, a ketrec, amely erősen károsodott sejtekre jellemző jegyeket mutat (Lehotzky et al., 2004).

Vizsgáltam a TPPP/p25 és a mikrotubuláris váz kölcsönhatásának következményeit sejtes szinten. Tranziensen transzfektált sejteket kezeltem vinblasztinnal, ami a mikrotubuláris rendszert destabilizálja. Megállapítottam, hogy a nem transzfektált, kontroll sejtekben a mikrotubuláris váz teljesen szétesett a kezelés hatására, a tubulin immuncitokémiája diffúz, homogén citoszolikus eloszlást mutat. Az EGFP-TPPP/p25 jelenlétekor mikrotubulusokat lehet azonosítani a transzfektált sejtekben, a vinblasztin kezelés ellenére. Az expresszálo sejt perifériáján nem, vagy

csak ritkán láthatóak mikrotubulusok. Ez alapján a TPPP/p25 stabilizálja a mikrotubuláris vázát a vinblasztin depolimerizációs hatása ellen. Ez azonban csak olyan mikrotubulusokra jellemző, amelyek a mag körül, vagy annak közelében, valószínűsíthetően már kötegelt formában vannak, és magasabb, intenzívebb expresszió is szükséges hozzá. A periférián lévő egyedi mikrotubulusokat kevésbé védte a TPPP/p25 jelenléte. Az EGFP-TPPP/p25 jele diffúzan oszlik el, ahol a mikrotubulusok depolimerizálódnak, ami arra utal, hogy más, éppen maradt sejtváz alkotókat nem rendez át a TPPP/p25. Ez alapján a TPPP/p25 stabilizációs hatása a kötegelt mikrotubulusok megjelenéséhez kapcsolódik. A depolimerizáció elleni védőhatást tisztított fehérjét felhasználva, *in vitro* is kimutattam. Ehhez paclitaxel-stabilizált mikrotubulusokat depolimerizáltam, Ca^{2+} , vinblasztin, és hűtés mellett, az így módosított polimerizációs rendszerben a mikrotubulusok depolimerizálnak, ami turbiditáscsökkenést okoz. Ha a melegen polimerizált mikrotubulusok rekombináns humán TPPP/p25-el inkubálódnak, a turbiditáscsökkenés csak részleges, azaz depolimerizációjuk részleges, mert a TPPP/p25 korábban már leírt mikrotubulus keresztkötése részleges védőhatást fejt ki, analóg módon a sejtrendszerben tapasztalattal (Lehotzky et al., 2004).

Mivel az aggreszóma keletkezését az ubiquitin-proteasóma rendszer (UPS) működésének zavaraihoz hozzák összefüggésbe, megvizsgáltam az MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al), egy specifikus UPS-gátló tripeptid aldehid hatását a transzfektált sejtek TPPP/p25 szintjére fluoreszcens mikroszkópia és képanalízis segítségével. Megállapítottam, hogy az UPS gátlása megnövelte a fluoreszcens jel szintjét az expresszálo sejtekben, ami arra mutat, hogy HeLa sejtekben a konstrukciót az UPS bontja le. Mivel a TPPP/p25 szerkezet nélküli fehérje, UPS-irányította lebontása eltávolításában aktívan részt vesz (Lehotzky et al., 2004).

Az UPS szerepének a TPPP/p25 lebontásában további vizsgálatára transzgén, indukálható módon expresszálo klónt állítottam elő CHO-Tet-On sejtvonalban. Az indukált és MG132-vel, illetve NH_4Cl -el kezelt sejtekben immunblottal mutattam ki a TPPP/p25 szintjét. Részleges indukció után az UPS gátlása MG132-vel megemelte a TPPP szintjét, míg a lizoszómális lebontás gátlószere, az NH_4Cl nem okozott változást. Ezzel megerősítettem, hogy a TPPP/p25 lebontásában elsődleges szerepet az UPS játszik (nem publikált eredmény).

VI.2.B TPPP/p25 transzgén vonal glükóz metabolizmusa (Orosz et al., 2004))

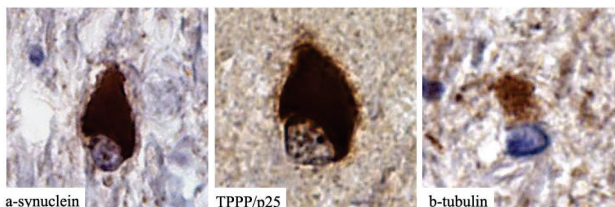
Mivel a tranzien expresszió során az ún. egy-sejt szintű vizsgálatokat végezhettem csak, megkíséreltem transzgén vonal izolálását, ami SK-N-MC humán neuroblasztómából sikeres volt,

így lehetővé tette populációs szintű vizsgálatok kivitelezését, azaz a TPPP/p25 expresszió hatásának vizsgálatát makromódszerekkel a sejt energiametabolizmusára. Vizsgáltuk az eredeti sejtvonal és egy kiválasztott klón (K4) közötti változásokat, elsősorban a sejt glükóz metabolizmusára koncentrálna. Fáziskontraszt mikroszkópiával megállapítottam, hogy a K4 klón és az eredeti vonal között nincs számottevő morfológiai eltérés. Fluoreszcens mikroszkópia segítségével megállapítottam, hogy a K4 sejtvonal kifejezi az EGFP-TPPP/p25-öt, ami hasonló lokalizációt mutat, ahogy azt korábban tranziensen transzfektált HeLa sejtekben tapasztaltam, vagyis specifikusan a mikrotubulus hálózaton kolokalizál. Az élő sejteket összehasonlítva, TMRE-t használva a mitokondriumok membránpotenciálfüggő jelzésére, a K4 sejtvonalban intenzívebb jelölés volt látható, ami arra utalt, hogy a transzgén sejtek intenzívebben metabolizálnak, összehasonlítva az anyavonallal. Metabolikus vizsgálatokban az egyes sejtvonalak citoszolikus extraktjait használva megállapítottam, hogy az ATP szintje megnövekedett a K4-ben, mintegy 50%-al. Ez alapján a mitokondriális hiperpolarizáció egyedi sejtek színjén detektált változása igazolódott a K4 sejtvonalban. Elemeztük az egyes glikolitikus enzimek aktivitását a sejtextraktumokban. Ez alapján következő aktivitásnövekedéseket tapasztaltam a hexokináz, glükóz-6-foszfát izomeráz, PFK, triófoszfát izomeráz és gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) esetében, az eredeti sejtvonallal összevetve: rendre nő 20%, 29%, 70%, 27%, 13%-al. Az aldoláz aktivitása nem változik a vizsgálat alapján. Az egyes glikolitikus enzimaktivitásokat felhasználva modelleztük a glikolitikus fluxust, és megállapítottuk, hogy fokozódott, mintegy 20%-al, ami összhangban van a teljes (citoszolikus és mitokondriális formában mért) ATP szint növekedésével, amihez a glikolízis során keletkező extra piruvát a mitokondriumok metabolizmusát fokozásával járul hozzá. Tehát a TPPP/p25 megjelenése fokozta a metabolikus aktivitást a transzgén sejtvonalban (Orosz et al., 2004).

VI.2.C TPPP/p25 kapcsolata neurodegenerációkkal (Kovács et al., 2004; Orosz et al., 2004; Oláh et al., 2006; Preusser et al., 2007)

Célunk a TPPP/p25 szélesebb körű vizsgálata volt fiziológias rendszerekben is, amihez esszenciális volt egy megfelelő tulajdonságú ellenanyag előállítása. Ehhez TPPP/p25 ellenes antiszérum karakterizálását, és specificitásának vizsgálatát végeztem el. Az immunválaszhoz a TPPP/p25 184-200 szekvenciarszlete elleni peptid-konjugátummal immunizáltunk patkányokat. Vizsgálataim szerint specifikusan felismeri a TPPP/p25-öt bakteriális homogenizátumban, marhaagy és humánagy citoszolikus extraktumokban. Humán rekombináns TPPP/p25-tel is

immunpozitivitást mutat, mind ELISA, mind immunblot kísérletek alapján. A peptid elleni szérum segítségével vizsgáltuk különböző neurodegeneratív betegek agyszöveti mintáit. Megállapítottuk, hogy a TPPP/p25 és az α -szinuklein elleni antitestek hasonló mértékben jelölik a neurodegeneráció jellemző zárványtesteket Parkinson-kór és szisztémás atrófia esetén. Továbbá, a jelölés specifikus szinukleinopátiákra; Alzheimer-kórban és más tauopátiák esetén a TPPP/p25 immunpozitivitás nem volt kimutatható.



Humán patológiás agyszövet immunhisztokémiai festése α -szinukleinre, TPPP/p25-re, és β -tubulinra.

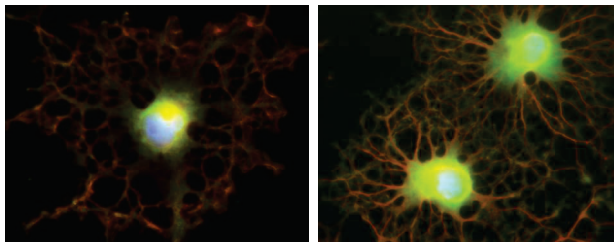
Normálállapotú oligodendrociták ezzel a szérummal eléggé gyenge immunpozitivitást mutattak. Így további antiszérumok fejlesztésével próbálkoztunk. Azonos módszereket felhasználva vizsgáltam a rekombináns humán TPPP/p25 elleni patkányban termeltetett antiszérumot. Ez a szérum is specifikus jelölést mutat *in vitro* és agyszövetben is, hasonlóan a peptid ellenes szérumhoz, azonban intenzívebben jelölte a normál agyszöveti oligodendrocitákat. Érdekes módon, a TPPP/p25 viszont nem detektálható transzformálódott sejtekben, oligodendrogliómákban, miközben az agyszövet egészséges részein lévő oligodendrocitákban igen. A tumor szöveti területére beszűrődő, vagy ott éppen maradt normálállapotú oligodendrocitákban is kimutatható volt. Ez alapján megállapítható, hogy a rákos transzformáció a TPPP/p25 expressziójának gátlásához vezethet (Kovács et al., 2004, Orosz et al., 2004; Preusser et al., 2007).

A TPPP/p25 patológiás előfordulásának következményeit tovább vizsgálva, elemeztem a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) lokalizációját EGFP-TPPP/p25 expresszáló sejtekben, illetve humán patológiás agyszövetben. Ennek háttérében az állt, hogy kimutattuk, a TPPP/p25 és a GAPDH *in vitro* kölcsönhatását, tisztított fehérjékkel, valamint agyszöveti homogenizátumban. A GAPDH a sejten belüli folyamatokra érzékenyen reagál, a mikrotubulusokon lokalizálódik, azokat keresztköti *in vitro*. Vizsgálataink szerint transziensen transzfektált HeLa sejtekben a GAPDH a citoszolban diffúzan oszlik el, aggreszóma képződése

esetén azonban feldúsul jele a magközei képletben. Ehhez kapcsolódóan, Parkinson-kórban vizsgáltuk a TPPP/p25 és a GAPDH együttes megjelenését a zárványtestekben. Ez alapján a már korábban azonosított TPPP/p25 immunpozitivitás mellett a GAPDH is azonosítható a betegségre jellemző zárványtestekben, az α -szinuklein mellett, vagyis az aggreszóma képződése sejtes szinten TPPP/p25 hatására hasonlítható a szöveti zárványképződéshez, ahol a TPPP/p25 előfordul (Oláh et al., 2006).

VI.3 TPPP/p25 szerepe az oligodendrocita differenciációban (Lehotzky et al., 2010)

Az ismert volt, hogy a TPPP/p25 normál agyszövetben oligodendrocitákban fordul elő. A fehérje oligodendrocitákban betöltött fiziológias funkciójának vizsgálatához tehát ezekkel a sejtekkel végeztem vizsgálatokat. Ezért egyrészt primer oligodendrocita sejteket izoláltam és differenciáltattam, másrészt megkezdttem egy speciális növekedési faktor-függő, patkány eredetű sejtvonal (CG-4; Louis et al., 1992) vizsgálatát. A vonalat Dr P. Lau (NIH NINDS) bocsátotta a rendelkezésemre, és vele kezdtük el az oligodendrocita fejlődésbiológia szabályozásának tanulmányozását. Megállapítottam fluoreszcens immuncitokémia, és immunblot módszerek alapján, hogy a sejtek alapállapotban alacsony, oligodendrocitává differenciáltatva pedig magas szinten tartalmazzák a TPPP/p25-öt. Az élő CG-4 sejtek morfológiai jegyeik alapján képesek a mielinizáció előtti alak kialakítására, és összehasonlíthatóak az izolált primer sejtekkel. Ezt immuncitokémiai vizsgálatokkal alátámasztottam.



CG-4 oligodendrocita immuncitokémiai vizsgálata MBP (piros) és TPPP/p25 (zöld) (bal oldalt), illetve α -tubulin (piros) és TPPP/p25 (zöld) (jobb oldalt) kettős jelöléssel. Magfestés, kék: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Kimutattam, hogy a IV típusú β -tubulin, valamint a mielin membrán protein jele megnövekedik a CG-4 prekursor sejtekből differenciálódó oligodendrocitákban, ahogy a TPPP/p25 is. A mielin membrán protein és a TPPP/p25 megoszlása, viselkedése

immuncitokémiai vizsgálataim alapján hasonló a CG-4 eredetű oligodendrocitákban és az izolált prekursor sejtekből differenciáltott patkány oligodendrocitákban. Érdekes kérdés volt a korábban megfigyelt mikrotubulus lokalizáció vizsgálata a prekursor és a differenciáltott sejteken. Megállapítottam, hogy prekursor sejtekben a TPPP/p25 nem lokalizálódik a mikrotubulusokon. Ez az átmeneti alakokra sem jellemző, a differenciáció korai szakaszában, amikor a sejtváz gyorsan változik. A korábban megfigyelt mikrotubulus lokalizáció csak az érett oligodendrocitákra jellemző, elsősorban az elsődleges nyúlványokban azonosítható, ahol kötegelt, párhuzamosan futó mikrotubulusok a jellemzőek. Ez felvetette, hogy oligodendrocitákban valamilyen szabályozási folyamat vagy partner jelenléte módosíthatja a mikrotubuláris váz és a TPPP/p25 kölcsönhatását.

Erre utal az is, hogy az általam végzett, primer sejtés immuncitokémiai vizsgálatban megfigyeltem egy, a sejt-sejt kontaktus hatására bekövetkező mikrotubuláris átrendeződést, aminek következtében a tubulin és a TPPP/p25 jelének kolokalizációja gyengült. Továbbá, a sejt perifériáján, ahol már a mikrotubulusok jelenlétét nem mutatom ki az általam használt antitestekkel, vagy csak minimális a tubulin jele, a TPPP/p25 diffúzan oszlik el, differenciálódott sejtekben is. Ez ugyanakkor egyszerűen magyarázható a sejtnyúlvány növekedésének mechanizmusával, mely szerint először az aktinváz polimerizációjával történik a nyúlvány kinövése, és a nyúlvány stabilizáció esetén épülnek fel a mikrotubulusok (Lehotzky et al., 2010)

A TPPP/p25 fiziológias szabályozásának felderítésére megvizsgáltam mRNA szekvenciáját, és génstruktúráját. Érdekes módon, 3'-UTR szakaszában egy konzervatív mikroRNS kötőhely található, a mir-206 mikroRNS-é. Dr. Lau igazolta ennek a kötőhelynek a működését mesterséges konstrukcióval, luciferáz aktivitás csökkenését mérve, de a szabályozási folyamat igazolásához fontos a sejt szintjén is igazolni a működést. Ennek előfeltétele volt, hogy a vizsgálandó oligodendrocita sejtekben ne legyen endogén mir-206 mikroRNS, amit Lau igazolt patkány oligodendrocitákra (Lau et al., 2009), és a CG-4 sejtvonalra is. Tehát célom volt azt bizonyítani sejt szinten, hogy ez a mikroRNS képes működni oligodendrocita sejtekben, ahol a TPPP/p25 endogén módon kifejeződik, vagyis a fehérje mRNA-n *in silico* kimutatott és *in vitro* működő kötőhelye funkcionális. Ehhez mir-206-ot és EmGFP-t hordozó plazmiddal transzfektáltam a CG-4 prekursor sejteket, és immuncitokémiával vizsgáltam a sejtek TPPP/p25 szintjét, a transzfektált sejteket a plazmidról átíródó EmGFP jele alapján azonosítva. Megállapítottam, hogy a transzfektált CG-4 oligodendrocita prekursor sejtekben a TPPP/p25 szintje csökken (~40 %-al). Ez alapján a mir-206 konzervatív kötőhelye a TPPP/p25 mRNA 3'-

UTR régióban (+58 pozíciótól) funkcionálisan aktív, és képes meggátolni a fehérje expresszióját. Megkíséreltem a differenciálódott sejteken is vizsgálni ezt a jelenséget, azonban a CG-4 sejtek mir-206 jelenléte esetén nem differenciálódnak, a megfelelő morfológia nem alakul ki, miközben az üres plazmid jelenléte esetén, vagy a tenyésztetben lévő nem transzfectált sejteknél a differenciáció megtörténik. A mir-206 mikroRNS hatását igazoltam izolált patkány oligodendrocitákban is, ahol a mielin bázikus protein és a TPPP/p25 párhuzamos kimutatásával elemeztem a mir-206-t hordozó vektorral transzfectált oligodendrociták morfológiai változását, a copGFP fluoreszcens fehérje jele alapján azonosítva a transzfectált sejteket. A mir-206 hatására nem alakul ki a differenciálódott sejtekre jellemző többszörösen elágazó sejtvez, továbbá a mielin bázikus protein expressziója nem azonosítható, vagy erősen gyengül. A csak copGFP-t hordozó vírussal fertőzött primer oligodendrociták képesek differenciálódni, és a mielin bázikus fehérje is kimutatható bennük. Mindezek alapján a TPPP/p25 gátlása mind CG-4 eredetű, mind izolált oligodendrocitákban mir-206 mikroRNS-el meggátolta az oligodendroglia jellemző sejtvez kialakulását, és a differenciációt. Ezen eredményeimet támasztották alá csoportunkban RNS interferenciával kapott adatok, mely szerint specifikus siRNS szelektíven gátolta a TPPP/p25 kifejeződését, ezzel az oligodendrociták differenciációját mind CG-4 eredetű, mind primer oligodendrocitákban. Következésképpen megállapítható, hogy a TPPP/p25 fontos szereppel bír a mielinizációhoz vezető mikrotubuláris alapú sejtvez kialakulásában és annak stabilizációjában, ami poszttranszkripcionális szinten szabályozódhat (Lehotzky, 2010).

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

A mikrotubuláris rendszer intracelluláris dekorációjában, ultrastruktúrái kialakulásában és szerteágazó fiziológiai funkcióik biztosításában a citoplazmatikus fehérjék dinamikus asszociációja (a statikusan kötődő, jól ismert MAP hatások mellett) fontos szerepet játszik. A mikrotubuláris váz dinamikus működése energiát igénylő folyamat, melyet a citoplazmatikus kompartmentben elsődlegesen a glükóz metabolizmusa biztosít a glikolízis révén. A glikolitikus enzimek mind szerkezeti, mind funkcionális jellemzői, beleértve az izomformák sejt-specifikus voltát, jól ismertek molekuláris szinten. Rendszer- és sejtszinten ezek a jellemzők kevésbé egyértelműek. Munkacsoportunk és más laboratóriumok az utóbbi évtizedben egyértelmű bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozólag, hogy a glikolitikus enzimek intracelluláris asszociációja, részben citoskeletális kötődésük, jelentős tényező az energiametabolizmusban,

elsősorban az ATP szintézisének szabályozásában. Ezen kutatásokhoz, illetve koncepcionális elképzelések igazolásához járultak hozzá azok az *in vitro* eredményeim, melyek a PFK, mint a glikolízis szabályozásában kulcsfontosságú szerepet betöltő enzim összetett szabályozására vonatkoznak. Megmutattam, hogy a PFK komplex szabályozási mechanizmusában fontos tényező a kináz oligomerizációs állapottól függő i) katalitikus aktivitása és ii) a tubulin/mikrotubulus rendszerrel való asszociációja. Ez biztosítani képes a mikrotubuláris rendszer által vezérelt szabályozási mechanizmust a PFK aktivitásának szabályozásán keresztül. A PFK-nak a glikolízis szabályozásában betöltött fontos szerepét mutatják sejtszinten kapott rendszerszintű eredményeim is, nevezetesen, hogy egy szerkezet nélküli fehérje, a TPPP/p25 kifejeződése, neuroblasztóma sejtekben stimulálja az energiametabolizmust, növeli az ATP szintet a glikolitikus fluxus aktiválódása révén.

Eredményeim azt is bizonyították, hogy a tubulin/mikrotubulus-PFK kölcsönhatás mindkét részvevő számára következménnyel jár, azaz a az enzimaktivitás változás mellett a mikrotubulusok polimerizációját is befolyásolja, amelynek eredményeképpen keresztkötött mikrotubuláris ultrastruktúrák alakulnak ki; a periodikus keresztkötések kialakításában a mikrotubulusokhoz asszociált dimer PFK molekulák asszociációja kulcsszerepet játszik. A mikrotubulus-PFK kölcsönhatás szerepe a glikolitikus folyamatban fontos, azonban rendszer szinten további glikolitikus enzimek kölcsönhatását egymással, valamint a mikrotubuláris rendszerrel, illetve más citoplazmatikus struktúrával is figyelembe kell venni (Ovádi, 1988; Knull, 1992). Munkacsoportunk egy közelmúltban publikált eredménye arra mutat rá, hogy a glikolitikus enzimek heteroasszociációi mikrokompartmentet létrehozva képesek Huntington-kóros transzgen egér betegségmodellben túlkompenzálni a szerkezet nélküli poli-Gln lánc kifejeződésekor a GAPDH 50%-os aktivitáscsökkenését az érintett szövetben (Oláh et al, 2008).

A munkacsoportunk a TPPP/p25-nek MAP fehérjeként való azonosítását azon megfigyelésének köszönhetette, hogy *in vivo* körülményeket modellezve (agyextraktumban) vizsgálta a glikolitikus enzimek kötődésének hatását a tubulin polimerizációra, mikrotubulus kialakulására. Miután az agyextraktum fokozta a polimerizációt, izolálták azt a fehérje komponens, ami felelős a hatásért. Ezt a komponens funkciója alapján Tubulin Polymerization Promoting Protein-nek (TPPP/p25) nevezték el; ma már így található az adatbázisokban és tudományos publikációkban. A csoport a fehérje számos szerkezeti és funkcionális jellemzőjét meghatározta; valamint azonosította és izolálta, illetve klónozták homológjait, a TPPP/p20-at és TPPP/p18-at. A fiziológiai funkciójának tanulmányozásához tervbe vették a fehérjék élő, egy-

sejtes fluoreszcencia mikroszkópiás vizsgálatát. Ekkor csatlakoztam több év után újra a kutatócsoporthoz, immár a Richter Nyrt.-ben szerzett „sejtbiológusi” tapasztalatokkal felvértezve (Pázmány et al., 2000; Lehotzky et al., 2002 (poszter)). Sejtbiológiai ismeretem, gyakorlatom alapján kialakítottunk egy eukarióta, elsődlegesen humán sejtvonalakkal foglalkozó kutatólaboratóriumot.

Fluoreszcens-jelzett fúziós fehérjék, illetve azzal párhuzamosan immuncitokémia vizsgálatok alkalmazása, a sejtek vizualizálása fluoreszcens és fáziskontraszt video-mikroszkópiás módszerekkel számos fontos, mikrotubuláris rendszerekre is vonatkozó megállapításhoz vezetett (Reits & Neeftjes, 2001; March et al., 2003). Kísérleteim, humán, élő és fixált, egy-sejtes vizsgálatok (EGFP-TPPP/p25-öt transzfektálva HeLa, SK-N-MC sejtekbe), arra az izgalmas kérdésre adtak sokrétű választ, hogy mit csinál élő sejtben egy szerkezet nélküli fehérje. Ezek a vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a TPPP/p25 elsődleges, kizárólagos citoszeletális célpontja a mikrotubuláris rendszer, melyet „bundling” aktivitása révén stabilizál, ellenállóvá teszi depolimerizációs hatásokkal szemben. Ez a hatás ugyanakkor nem gátolja meg a mikrotubuláris rendszer átrendeződését. Ennek valószínű oka, hogy a TPPP/p25 kötegelő hatása ellenére a mikrotubulusokhoz való kötődése dinamikus, mint azt a FRAP kísérleteink mutatták. Továbbá foszforilációval is szabályozódhat kölcsönhatása a mikrotubulusokkal (Hlavanda et al., 2007)

A TPPP/p25 elsődlegesen az agyszövetben, oligodendrocitákban fejeződik ki fehérje szinten. Arra a kérdésre kerestem választ, hogy miért és mikor lehet szükség az oligodendrocitákban a mikrotubuláris rendszer stabilizálására. A progenitor sejtek mozgása az axonok irányába, a kontaktus felvétele után differenciációjuk elengedhetetlen az axonokat körülvevő mielinhüvely kialakításához, amely a megfelelő ingerületátvitelhez szükséges. Vizsgálataim egyértelműen bizonyították, hogy a TPPP/p25 expressziója fokozódik a differenciáció, a mikrotubuláris alapú nyúlványok kialakulása során; e folyamatban a mikrotubuláris rendszer reorganizációja intenzíven zajlik. Kimutattam, hogy TPPP/p25 kifejeződésének specifikus mikroRNS-sel való gátlása következtében a differenciáció nem következik be. Ezen eredmények két fontos következtetést engednek levonni: egyrészt, a TPPP/p25 kulcsszereplője a mielinizációs folyamatnak, másrészt a TPPP/p25 kifejeződése poszttranszkripció szinten modulálható. Ezen eredmények irányították munkacsoportunk figyelmét a TPPP/p25 és a *sclerosis multiplex* betegség kapcsolatára, ami alapvetően a mielinhüvelyt biztosító oligodendrociták károsodásának a következménye.

Nyilvánvalóvá tettük a TPPP/p25 kapcsolatát más patológias folyamatokkal, aminek a kiinduló pontja az a kísérleti felismerésem volt, hogy a TPPP/p25 túlzott kifejeződése aberráns mikrotubuláris ultrastruktúrák kialakulását eredményezi, amelyek közül az egyik forma vizsgálataim alapján aggreszóma. Az aggreszóma a sejt perinukleáris régiójában, a centroszóma körül kialakuló, a magmembrán torzító képződmény, melynek kialakulásához a mikrotubuláris rendszer aktív működése is szükséges. Az aggreszóma képződését először Johnston és munkatársai írták le, egy mutáció következtében hibás szerkezetű fehérje expresszióját kísérő jelenséggént (Johnston et al., 1998). A működésképtelen, vagy hibás szerkezetű, vagy a rendezetlen, „ragados” tulajdonságú fehérjéket, mint a szerkezet nélküli fehérjéket az ubiquitin-proteaszóma (UPS) rendszer ismeri fel, és bontja le. A felismeréshez és a lebontáshoz szükséges a mikrotubuláris rendszer működése is, amely a szubsztrátként felismert fehérjéket a centroszóma környékére szállítja (Kawaguchi et al., 2003). A szállítás és az UPS működése is ATP-függő, emiatt a sejt energiaállapota, a metabolikus aktivitás is befolyásolja a rendszer működését, illetve extra energiaigényt jelent megjelenése, vagy feleslege a sejt számára, azaz proteolitikus stresszt idéz elő (McNaught & Olanow, 2003). Az ilyen mesterségesen létrehozott zárványtest-szerű képlet, vagy a tenyésztett sejtben generált aggreszóma, és a neurodegeneratív betegségekben azonosítható zárványtestek teljesen hasonló mechanizmusokkal képződnek (Olanow & McNaught, 2006).

A TPPP/p25 szintjét a sejtben vizsgálataim szerint a proteaszóma rendszer gátlása fokozza. Következésképpen a TPPP/p25 magas szintű kifejeződése a proteaszóma rendszer gátlásával, túlterhelésével proteolitikus stresszt idéz elő. Azt lehet tehát mondani, hogy a TPPP/p25 alapú aggreszóma kialakulása mimikálja a patológias agyszöveti zárványtestek kialakulását. Vizsgálataink bizonyították, hogy a TPPP/p25 felhalmozódik patológias agyszövetek neuronjaiban, gliális sejtjeiben, ko-lokalizál az α -szinukleinnel. A TPPP/p25 megjelenése zárványtestekben specifikusnak tekinthető Parkinson-kórra és más szinukleinopátiákra, míg a jelenség Alzheimer-kórra és más tauopátiákra nem volt jellemző. Tehát azon túlmenően, hogy a TPPP/p25-öt, mint új MAP fehérjét sikerült azonosítani, megállapítható, hogy ez a fehérje szinukleinopátiák potenciális biomarkere. Továbbá az általam vizsgált sejtes rendszerek, vagy módosított változatuk alkalmasak lehetnek egyes neurodegeneratív betegségek folyamatainak molekuláris és sejtszintű vizsgálatára.

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

- Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001 107(7):823-6.
- Bartzokis G. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004 (1):5-18.
- Aragón JJ, Sols A. Regulation of enzyme activity in the cell: effect of enzyme concentration. *FASEB J*. 1991 Nov;5(14):2945-50.
- Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia*. 2009 (16):1691-705.
- Collins TJ, Bootman MD. Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. *J Exp Biol*. 2003 206(Pt 12):1993-2000.
- Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradović Z. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*. 2002 41(21):6573-82.
- Dunker AK, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Yang JY, Chen JW, Vacic V, Obradovic Z, Uversky VN. The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics*. 2008 Sep 16;9
- Dyson HJ, Wright PE. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2002 12(1):54-60.
- Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem*. 2009 109(3):683-93.
- Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*. 2003 426(6968):895-9.
- Hagen JW, Lai EC. microRNA control of cell-cell signaling during development and disease. *Cell Cycle*. 2008 (15):2327-32.
- Hlavanda E, Kovács J, Oláh J, Orosz F, Medzihradsky KF, Ovádi J. Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations. *Biochemistry*. 2002 41(27):8657-64.
- Hlavanda E, Klement E, Kókai E, Kovács J, Vincze O, Tökési N, Orosz F, Medzihradsky KF, Dombrádi V, Ovádi J. Phosphorylation blocks the activity of tubulin polymerization-promoting protein (TPPP): identification of sites targeted by different kinases. *J Biol Chem*. 2007 282(40):29531-9.
- Jiang C, Schuman EM. Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. *Trends Biochem Sci*. 2002 27(10):506-13.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 1998 143(7):1883-98.
- Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003 115(6):727-38.

- Knull HR, Walsh JL. Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Curr Top Cell Regul.* 1992;33:15-30.
- Lau P, Verrier JD, Nielsen JA, Johnson KR, Notterpek L, Hudson LD. Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J Neurosci.* 2008 28(45):11720-30.
- Louis JC, Magal E, Muir D, Manthorpe M, Varon S. CG-4, a new bipotential glial cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. *J Neurosci Res.* 1992 31(1):193-204.
- Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol.* 2006 209(12):2304-11.
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging.* 1995 16(3):355-62.
- March JC, Rao G, Bentley WE. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003 62(4):303-15.
- McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S73-84.
- Na GC, Timasheff SN. Physical properties of purified calf brain tubulin. *Methods Enzymol.* 1982;85 Pt B:393-408.
- Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem.* 2000 69:277-302.
- Oakley BR. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* 2000 10(12):537-42.
- Oláh J, Klivényi P, Gardián G, Vécsei L, Orosz F, Kovacs GG, Westerhoff HV, Ovádi J. Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice. *FEBS J.* 2008 275(19):4740-55.
- Olanow CW, McNaught KS. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2006 (11):1806-23.
- Orosz F, Ovádi J. TPPP orthologs are ciliary proteins. *FEBS Lett.* 2008 582(27):3757-64.
- Ovádi J, Aragón JJ, Sols A. Phosphofructokinase and fructosebiphosphatase from muscle can interact at physiological concentrations with mutual effects on their kinetic behavior. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 35(3):852-6.
- Ovádi J. Old pathway--new concept: control of glycolysis by metabolite-modulated dynamic enzyme associations. *Trends Biochem Sci.* 1988 13(12):486-90.
- Ovádi J. Physiological significance of metabolic channelling. *J Theor Biol.* 1991 152(1):1-22.
- Pauling L, Delbrück M. The nature of the intermolecular forces operative in biological processes. *Science.* 1940 92(2378):77-79.
- Pettigrew DW, Frieden C. Binding of regulatory ligands to rabbit muscle phosphofructokinase. A model for nucleotide binding as a function of temperature and pH. *J Biol Chem.* 1979 254(6):1887-95.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol.* 2006 16(21):2166-72.

- Reits EA, Neeffjes JJ. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol.* 2001 3(6):E145-7.
- Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron.* 2001 (1):15-32.
- Short DM, Heron ID, Birse-Archbold JL, Kerr LE, Sharkey J, McCulloch J. Apoptosis induced by staurosporine alters chaperone and endoplasmic reticulum proteins: Identification by quantitative proteomics. *Proteomics.* 2007 (17):3085-96.
- Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature.* 2009 457(7228):396-404.
- Takahashi M, Tomizawa K, Fujita SC, Sato K, Uchida T, Imahori K. A brain-specific protein p25 is localized and associated with oligodendrocytes, neuropil, and fiber-like structures of the CA3 hippocampal region in the rat brain. *J Neurochem.* 1993 60(1):228-35.
- Thompson AJ, Barrow CJ. Protein conformational misfolding and amyloid formation: characteristics of a new class of disorders that include Alzheimer's and Prion diseases. *Curr Med Chem.* 2002 9(19):1751-62.
- Verdier-Pinard P, Pasquier E, Xiao H, Burd B, Villard C, Lafitte D, Miller LM, Angeletti RH, Horwitz SB, Braguer D. Tubulin proteomics: towards breaking the code. *Anal Biochem.* 2009 15;384(2):197-206.
- Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle.* 2007 Sep 1;6(17):2152-60.
- Wade RH. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol.* 2009 43(2):177-91.
- Wang SZ, Dulin J, Wu H, Hurlock E, Lee SE, Jansson K, Lu QR. An oligodendrocyte-specific zinc-finger transcription regulator cooperates with Olig2 to promote oligodendrocyte differentiation. *Development.* 2006 133(17):3389-98.

IX. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

- Lehotzky A**, Telegdi M, Liliom K, Ovádi J. Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects. *J Biol Chem.* 1993 268(15) 10888-94.
- Lehotzky A**, Pálfia Z, Kovács J, Molnár A, Ovádi J. Ligand-modulated cross-bridging of microtubules by phosphofructokinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 204(2) 585-91.
- Vértessy BG, Kovács J, Löw P, **Lehotzky A**, Molnár A, Orosz F, Ovádi J. Characterization of microtubule-phosphofructokinase complex: specific effects of MgATP and vinblastine. *Biochemistry.* 1997 36 (8) 2051-62.
- Lehotzky A**, Tirián L, Tökési N, Lénárt P, Szabó B, Kovács J, Ovádi J. Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival. *J Cell Sci.* 2004 117(Pt 25) 6249-59.
- Orosz F, Kovács GG, **Lehotzky A**, Oláh J, Vincze O, Ovádi J. TPPP/p25: from unfolded protein to misfolding disease: prediction and experiments. *Biol Cell.* 2004 96(9) 701-11.
- Kovács GG, László L, Kovács J, Jensen PH, Lindersson E, Botond G, Molnár T, Perczel A, Hudecz F, Mezo G, Erdei A, Tirián L, **Lehotzky A**, Gelpi E, Budka H, Ovádi J. Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies. *Neurobiol Dis.* 2004 17(2) 155-62.
- Oláh J, Tökési N, Vincze O, Horváth I, **Lehotzky A**, Erdei A, Szájli E, Medzihradsky KF, Orosz F, Kovács GG, Ovádi J. Interaction of TPPP/p25 protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and their co-localization in Lewy bodies. *FEBS Lett.* 2006 580(25) 5807-14.
- Preusser M, **Lehotzky A**, Budka H, Ovádi J, Kovács GG. TPPP/p25 in brain tumours expression in non-neoplastic oligodendrocytes but not in oligodendroglioma cells. *Acta Neuropathol.* 2007 113 (2) 213-5.
- Lehotzky A**, Lau P, Tökési N, Muja N, Hudson LD, Ovádi J. Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) is critical for oligodendrocyte differentiation. *Glia.* 2010 58(2) 157-68.

A dolgozat tárgyát nem képező közlemények

- Tókesi N, **Lehotzky A**, Horvath I, Szabo B, Olah J, Lau P, Ovádi J. TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6. J Biol Chem. 2010 (10.1074/jbc.M109.096578)
- Lehotzky A**, Tókesi N, Gonzalez-Alvarez I, Merino V, Bermejo M, Orosz F, Lau P, Kovács GG, Ovádi J. Progress in the development of early diagnosis and a drug with unique pharmacology to improve cancer therapy. Philos Transact A Math Phys Eng Sci. 2008 Oct 13; 366 (1880) 3599-617.
- Kovács GG, Gelpi E, **Lehotzky A**, Höftberger R, Erdei A, Budka H, Ovádi J. The brain-specific protein TPPP/p25 in pathological protein deposits of neurodegenerative diseases. Acta Neuropathol. 2007 113 (2) 153-61.
- Vincze O, Tókesi N, Oláh J, Hlavanda E, Zotter A, Horváth I, **Lehotzky A**, Tirián L, Medzihradszky KF, Kovács J, Orosz F, Ovádi J. Tubulin polymerization promoting proteins (TPPPs): members of a new family with distinct structures and functions. Biochemistry. 2006 45 (46) 13818-26.
- Pázmány T, Kósa JP, Tomasi TB, Mechtler L, Turóczi A, **Lehotzky A**. Effect of transforming growth factor-beta1 on microglial MHC-class II expression. J Neuroimmunol. 2000 103(2) 122-30.
- Vértessy BG, Bánkfalvi D, Kovács J, Löw P, **Lehotzky A**, Ovádi J. Pyruvate kinase as a microtubule destabilizing factor in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1999 254(2) 430-5.
- Liliom K, **Lehotzky A**, Molnár A, Ovádi J. Characterization of tubulin-alkaloid interactions by enzyme-linked immunosorbent assay. Anal Biochem. 1995 228(1) 18-26.

Könyvfejezet

- Orosz F, **Lehotzky A**, Oláh J and Ovádi J (2009) TPPP/p25 A New Unstructured Protein Hallmarking Synucleinopathies. in Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases, 225-250

Poszter

- Lehotzky A**, Kósa J. P, Gassen M., Barnickel G., Hölzemann G., Kis-Varga Á., Dézsi L. and Pázmány T.: Identification of selective inhibitor of microglial nitric oxide release. 4th

Előadások

Lehotzky A, Tirián L, Tőkési N, Zotter Á, Szabó Kovács J, és Ovádi J. TPPP/p25: egy új szerkezetnélküli fehérje és a neurodegeneráció kapcsolata. VI. Magyar Genetikai Kongresszus / XIII. Sejt-és Fejlődés biológiai Napok, Eger, 2005

Lehotzky A, Tőkési N, Ovádi J. Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival. Straub Napok, Szeged, 2005

X. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikrotubuláris (MT) rendszer az eukarióta sejt váz kulcsfontosságú komponense, fiziológiai funkcióit jellemzően másodlagos módosítások és Mikrotubulus Asszociált Proteinek kölcsönhatásai, sejt- és szövet-specifikus módon határozzák meg. Ugyanakkor számos citoplazmatikus fehérje dinamikus asszociációja mikrotubuláris ultrastruktúrák létrehozásával megváltoztathatja vagy módosíthatja funkcióját, fiziológias vagy patológias következményeket idézve elő. Dolgozatom tárgya két, teljesen különböző szerkezetű és funkciójú fehérje és a mikrotubuláris rendszer kapcsolatának molekuláris és sejtszintű jellemzése: a foszfofruktokináz (PFK), a glikolízis egyik kulcs enzime, és a TPPP/p25 (Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25), egy agyspecifikus szerkezet nélküli fehérje. Kimutattam, hogy a tetramer PFK dimer formája kötődik a mikrotubulusokhoz, ami az enzim aktivitásának csökkenését eredményezi; ugyanakkor a MT-asszociált dimerek képesek a MT-okat keresztkötni, ami a MT stabilitását növeli. A heterológ PFK-MT asszociáció az enzim fiziológias ligandjaival modulálható. A kötődési és funkcionális vizsgálatok eredményei alapján felállított molekuláris modell egyértelművé tette a PFK-MT kölcsönhatás lehetséges szerepét az energiametabolizmus szabályozásában. A TPPP/p25-öt munkacsoportunk azonosította agyszövetből izolálva, mint szerkezet nélküli fehérjét, amely tubulin polimerizációt indukál. A fehérje oligodendrocitákban, az agyszövet legintenzívebben metabolizáló sejtjeiben fejeződik ki elsődlegesen. Munkacsoportunkban létrehozott sejtlaboratóriumban molekuláris biológiai módszerekkel, humán neuroblasztóma és adenokarcinóma, valamint patkány oligodendrocita sejteken vizsgáltam a TPPP/p25 intracelluláris kifejeződését, fiziológias és patológias hatásait. Kimutattam, hogy sejtekben a TPPP/p25 a MT-okon kolokalizál, köteget, ezáltal stabilizálja őket. Intracellulárisan a TPPP/p25 szintet az ubiquitin-proteasóma rendszer működése szabályozza. A TPPP/p25 jelenléte fokozott mitokondriális polarizációt okoz a sejtben, ezzel összhangban, az ATP-tartalom növekedik, az ok a PFK és más glikolitikus enzimek aktivitásának növekedése. Bizonyítottam, hogy az oligodendrocita differenciáció során a TPPP/p25 expressziója fokozódik, amit ha specifikus mikroRNS-e, a miR-206 gátol, a differenciációra jellemző nyúlványok nem alakulnak ki. Vizsgálataim alapján a TPPP/p25 jelenléte a MT-alapú nyúlványképződéshez, tehát a mielin hüvely kialakulásához elengedhetetlen. Bizonyítottam, hogy a TPPP/p25 túltermelése transzfektált HeLa sejtekben aberráns MT ultrastruktúrát, aggreszómát vagy ketrecet hoz létre. A TPPP/p25-alapú aggreszóma kialakulása élő sejtben mimikálni képes a patológias zárványtest képződést, mely szinukleuinopátiák, mint a Parkinson-kór, jellemzője. Így a TPPP/p25-transzfektálással létrehozott humán sejttes betegségszámológ model használható lehet egyes központi idegrendszeri megbetegedésekben történő molekuláris mechanizmusok vizsgálatához.

XI. SUMMARY

The microtubular network (MT) is a key component of the cytoskeleton of eukaryotic cells: its physiological function is dominantly determined by post-translational modifications and interactions with Microtubule Associated Proteins by cell and tissue specific manners. Moreover, most of the cytoplasmic proteins are able to associate dynamically with MTs generating ultrastructural complexes, which is accompanied by functional changes or modifications with physiological as well as pathological consequences. The major objective of my PhD thesis was the characterization of two functionally and structurally different proteins and their interactions with the MT system at molecular and cellular level which were the phosphofructokinase (PFK), an important glycolytic enzyme; and the Tubulin Polymerization Promoting Protein (TPPP/p25), a brain-specific intrinsically unstructured protein. Within the frame of this work the preferential binding of the dissociated, dimeric form of the tetramer PFK to MTs was demonstrated which resulted in decreased enzyme activity as well as the periodic cross-linking of MTs due to the bundling activity of the dimeric PFK, which enhanced the stability of MTs. The heterologous associations of PFK with MT were modulated by physiological ligands, and the system of multiple equilibria was modeled. The binding and functional studies unambiguously showed the potential role of the interactions of PFK with tubulin/MT in the regulation of energy metabolism. The characterization of the intracellular features of TPPP/p25 in transfected human neuroblastoma and adenocarcinoma cells as well as in rat oligodendrocytes, the *in vitro* characteristics of which have been quite well established in our research group, was the other major objective of my thesis. Alignment of TPPP/p25 along the MT network was shown which resulted in stabilization, cross-linking of MT network and increased mitochondrial membrane polarization leading to increased intracellular ATP level related to the activation of PFK and other glycolytic enzymes. The TPPP/p25 expression level was found to be controlled at protein level by the proteasome system and at post-transcriptional level by specific microRNA, miR-206. In fact, TPPP/p25 level significantly enhanced during the differentiation of progenitor oligodendrocytes, but its depletion counteracted the extension of projections indicating that the presence of TPPP/p25 is indispensable for the MT-derived myelination. The over-expression of TPPP/p25 could lead to the formation of aberrant MT ultrastructures such as aggresomes and perinuclear cages. The formation of aggresomes in live human cell mimics the formation of pathological inclusions characteristic for Parkinson's disease and other synucleinopathies but not tauopathies. Thus the cell model evolved by transfection of TPPP/p25 could be a potential target to establish the etiology of certain CNS disease at molecular level.